



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 37 562 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/483
G 01 N 33/68
G 01 N 21/64
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/53

⑲ Aktenzeichen: 197 37 562.6
⑳ Anmeldetag: 28. 8. 97
㉓ Offenlegungstag: 6. 5. 99

DE 197 37 562 A 1

⑦① Anmelder:
Otogene Biotechnologische Forschungs- und
Entwicklungs GmbH, 72076 Tübingen, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Ruff, Beier und Partner, 70173
Stuttgart

⑦② Erfinder:
Paysan, Jacques, Dr., 72076 Tübingen, DE; Herlitze,
Stefan, Dr., 72076 Tübingen, DE; Antz, Christof, Dr.,
72076 Tübingen, DE; Ruppertsberg, J.-Peter, Prof.
Dr., 72076 Tübingen, DE

⑥⑥ Entgegenhaltungen:
EP 06 68 498 A2
WO 97 28 261 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen bzw. Peptiden

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur
Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen Protei-
nen bzw. Peptiden mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-
Transfer.

DE 197 37 562 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen bzw. Peptiden mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer.

Die Identifizierung und Analyse von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen bzw. Peptiden oder Fragmenten davon stellt ein wichtiges Problem der biomedizinischen Forschung und Biotechnologie dar. Ende der 80iger Jahre wurde deshalb ein System entwickelt, das unter der Bezeichnung "Yeast Two-Hybrid-System" in der Forschung große Bedeutung erlangt hat (Fields et al., Nature 340, S. 245-247 (1989)). Dieses System basiert auf der Entdeckung, daß zelluläre Transkriptionsaktivatoren, wie z. B. GAL4 oder lexA aus Hefe, in zwei unabhängige Funktionsdomänen zerlegt werden können. Beide Domänen sind normalerweise Bestandteil eines Proteins im Zellkern der Hefezelle, welches an bestimmte aktivierende Sequenzen verschiedener Zielgene bindet und deren Transkription reguliert. Dabei bindet die eine Domäne, die DNA-Bindungsdomäne (BD), spezifisch an eine bestimmte DNA-Zielsequenz (upstream activating sequence) in der Nähe des Zielgenpromotors. Die andere Domäne, die Aktivierungsdomäne (AD), erhöht die Transkriptionsrate des Zielgens durch Wechselwirkung mit dem Transkriptionsinitiationskomplex, der am Promotor des Zielgens gebunden ist. Im "Yeast Two-Hybrid-System" wird diese Struktur von Transkriptionsfaktoren in veränderter Form ausgenutzt. Die DNA-Bindungsdomäne (BD) von GAL4 oder lexA wird dort als Fusionsprotein mit einem "Köderprotein oder -peptid" in Hefezellen exprimiert. Dieses Fusionsprotein besitzt außerdem ein Kernlokalisierungssignal, durch welches es in den Zellkern der Hefe transportiert wird. Das Köder-Fusionsprotein bindet dort an eine Zielsequenz (UAS), die sich in dem verwendeten Hefestamm in der Nähe der Promotoren von zwei Reportergenen (z. B. auxotropher Marker (HIS3) und enzymatischer Marker lacZ)) befindet. Dadurch entsteht eine Konstellation, in der das Köderprotein oder -peptid in direkter räumlicher Nähe des Reportergenpromotors exponiert wird. In derselben Hefezelle wird nun zusätzlich ein zweites Fusionsprotein exprimiert. Dieses besteht aus der Aktivierungsdomäne (AD) von GAL4 oder lexA und einem Beuteprotein oder -peptid. Es besitzt ebenfalls ein Kernlokalisierungssignal. Das Beute-Fusionsprotein wird also auch in den Zellkern der Hefe transportiert. Falls nun das Beuteprotein und das an der UAS exponierte Köderprotein eine physikalische Wechselwirkung miteinander eingehen, dann erhöht sich die statistische Wahrscheinlichkeit, daß die Aktivierungsdomäne sich in der Nähe des Reportergenpromotors aufhält. Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Transkription der Reportergene, deren Ausmaß proportional zur Stärke der Wechselwirkung zwischen Köder- und Beuteprotein ist. Das "Yeast Two-Hybrid-System" kann sowohl zur quantitativen Analyse bekannter Beute/Köderpaare als auch zur Identifizierung unbekannter Beuteproteine oder -peptide verwendet werden. Dabei kommen als Beuteproteine z. B. eine cDNA-Bibliothek oder auch eine kombinatorische Peptidbibliothek in Frage.

Trotz der oben beschriebenen -vielseitigen Anwendungsbereiche weist das "Yeast Two-Hybrid-System" Einschränkungen aufgrund des transkriptionsabhängigen Detektionssystems auf. Diese treten beispielsweise dann auf, wenn das Beute- und/oder Köderprotein selbst Lokalisierungssignale enthalten. Diese störenden Lokalisierungssignale sind z. B. hydrophobe Transmembrandomänen, wie sie in vielen Membranproteinen auftreten. Sie führen zu einem Transport des Fusionsproteins in die Zellmembran, während das Kernlokalisierungssignal des Fusionsproteins ignoriert wird.

Wechselwirkungen mit Proteinen, die solche Transmembrandomänen aufweisen, können deshalb nicht detektiert werden. Ein weiteres Problem besteht beim Screening zur Analyse von cDNA-Bibliotheken oder kombinatorischen Peptid-Bibliotheken, die nur in begrenztem Umfang durchzuführen sind. Letztere stellen aufgrund ihrer Komplexität (z. B. mehr als 10 Billionen mögliche Varianten für ein Zehnerpeptid) ein effizientes Screening vor unlösbare Probleme. Die Analyse möglicher Wechselwirkungspartner erfolgt dabei bisher dadurch, daß maximal 50000 transformierte Hefezellen pro Agarplatte ausplattiert werden und zunächst 3-7 Tage im Brutschrank inkubiert werden. Dies bedeutet, daß ein typischer Test in der Größenordnung von 5 Millionen möglichen Fusionsproteinpaaren bereits die Verwendung von 100 Agarplatten erfordert, die durchgetestet werden müssen. So ist das "Yeast Two-Hybrid-System" für diese Screening-Vorgänge mit einem hohen Aufwand für Material, Zeit, Arbeitskraft und Kulturraum verbunden. Außerdem ist kein automatisiertes Verfahren zur Analyse bekannt, das den hohen Arbeitsaufwand für Laborkräfte reduzieren und standardisieren würde.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Verfahren zur Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen bzw. Peptiden bereitzustellen, das die obigen Nachteile vermeidet und dabei insbesondere automatisiert durchgeführt werden kann.

Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

Insbesondere wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gelöst, in dem mindestens zwei Proteine oder Peptide an unterschiedliche fluoreszierende Komponenten gekoppelt sind, wobei die Absorptions- und Emissionsspektren der fluoreszierenden Komponenten derart überlappen, daß Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) möglich ist und die Komponenten durch eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen bzw. Peptiden so zusammengebracht werden, daß FRET auftritt und gemessen wird.

Ganz besonders wird die obige Aufgabe durch ein Verfahren gelöst, in dem in einem Expressionssystem die genetische Information für mindestens zwei Fusionspeptide bzw. -proteine aufweisend einen Peptid- bzw. Proteinanteil und je ein unterschiedliches fluoreszierendes Protein bzw. Peptid in eine Wirtszelle eingebracht wird, wobei die Emissions- und Absorptionsspektren der fluoreszierenden Proteine bzw. Peptide derart überlappen, daß Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auftritt und in der Wirtszelle gemessen wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sollen die Begriffe "Protein" und "Peptid" gegeneinander austauschbar sein und eine Aminosäuren-Aneinanderreihung jeglicher Länge und Komplexität beinhalten, d. h. Dipeptide, Oligopeptide, Polypeptide, vollständige Proteine, Fragmente davon, Antikörper, Domänen, Epitope usw. Insbesondere kann es sich um kombinatorische Peptidbibliotheken oder die Expressionsprodukte von cDNA-Bibliotheken handeln. Insgesamt unterliegen die auf Wechselwirkungen zu untersuchenden Proteine/Peptide keinerlei Beschränkungen und sind frei wählbar.

Erfindungsgemäß soll unter einer fluoreszierenden Komponente ein Material bzw. sollen Partikel verstanden werden, die an der Oberfläche eine fluoreszierende Markierung aufweisen. Dies können Latex-Partikel sein oder Matrices, wie sie für die automatische Proteinsynthese üblich sind.

Erfindungsgemäß soll unter Kopplung eine mehr oder weniger feste Bindung der fluoreszierenden Komponente an das bzw. die Proteine oder Peptide verstanden werden. Diese Bindung kann mehr adsorptiver Natur sein oder es kann sich auf der anderen Seite auch um eine kovalente Bindung han-

deln. In einer bevorzugten Ausführungsform können das Protein bzw. Peptid und die fluoreszierende Komponente in Form eines Fusionsproteins bzw. -peptids vorliegen. Die Kopplung kann auch mittels eines Linkers stattfinden. Dieser umfaßt Verbindungen jeglicher Art, die zur Verknüpfung zweier Moleküle geeignet sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf dem Phänomen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET), der in Fig. 1 schematisch gezeigt ist. Ein fluoreszierendes Molekül absorbiert Photonen mit einer charakteristischen Wellenlänge und setzt die so aufgenommene Energie innerhalb kürzester Zeit durch Emission von Photonen wieder frei, was eine meßbare Fluoreszenz hervorruft. Da während dieses Prozesses ein gewisser Energieverlust durch Wärmeentwicklung auftritt, hat das emittierte Photon einen charakteristisch verminderten Energiegehalt und somit eine veränderte Wellenlänge gegenüber dem zuvor absorbierten Photon (Stoke'sche Verschiebung). Beide Parameter, nämlich Absorptionswellenlänge und Stoke'sche Verschiebung (und davon abhängig auch die Emissionswellenlänge) sind charakteristische Parameter eines jeden fluoreszierenden Moleküls und hängen von dessen Beschaffenheit ab. Ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer läßt sich nun messen, wenn zwei fluoreszierende Moleküle in einer Mischung miteinander in Wechselwirkung treten und die Adsorptionswellenlänge des einen mit der Emissionswellenlänge des anderen überlappt. In diesem Zusammenhang sei auf die Fig. 2 und 3 hingewiesen. Wird durch Licht der Wellenlänge λ_1 das fluoreszierende Molekül F1 angeregt, so emittiert F1 Licht der Wellenlänge $\lambda_1 + s_1$, wobei s_1 der Betrag der Stoke'schen Verschiebung von F1 ist. Das zweite fluoreszierende Molekül F2 kann dieses Licht absorbieren, wenn sein Absorptionsmaximum λ_2 mit $\lambda_1 + s_1$ überlappt oder im Idealfall übereinstimmt. Das so durch $\lambda_1 + s_1$ angeregte F2 wird seinerseits die Wellenlänge $\lambda_2 + s_2$ emittieren. Da diese Wellenlänge nicht charakteristisch für F1 ist, kann man auf einen erfolgten Energietransfer zwischen F1 und F2 schließen. Die Häufigkeit solcher Transferereignisse ist statistisch. Die Effizienz des Energietransfers ist proportional zu r^{-6} , wobei r der mittlere Abstand zwischen den beiden fluoreszierenden Molekülen ist. Jede Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen und jede Erhöhung ihrer Affinität zueinander, wird deshalb zu einem dramatischen Anstieg in der Häufigkeit von Energietransferereignissen und damit zu einer meßbaren Erhöhung des FRET führen. FRET kann somit als Indikator für die Affinität zwischen fluoreszierenden Molekülen herangezogen werden. Die Detektion von FRET kann durch bekannte fluorometrische Methoden, z. B. fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) oder Fluoreszenzmikroskopie, erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die genetische Information für zwei Fusionsproteine (im nachfolgenden A und B genannt) gemeinsam in einer Wirtszelle, bevorzugt eukaryotischen Zelle, exprimiert und Änderungen im Fluoreszenzspektrum dieser Zelle als Kriterium für eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Fusionsproteinen herangezogen.

Dabei besteht das Fusionsprotein A aus einem Protein bzw. Peptid (auch Köderprotein/-peptid genannt), für die ein unbekannter Wechselwirkungspartner identifiziert oder ein bekannter Wechselwirkungspartner charakterisiert werden soll. Das Köderprotein ist mit einem fluoreszierenden Protein (FP-A) gekoppelt. Das Fusionsprotein B besteht aus einem bekannten oder unbekannten Protein bzw. Peptid (auch Beuteprotein/-peptid genannt), dessen physikalische Bindungsfähigkeit charakterisiert werden soll. Das Beuteprotein ist an ein anderes fluoreszierendes Protein (FP-B) gekoppelt.

Die fluoreszierenden Proteine bzw. Peptide FP-A und FP-B zeichnen sich dadurch aus, daß sich die Emissions- und Absorptionsspektren von FP-A und FP-B derart überlappen, daß Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen den beiden Molekülen möglich wird. Dafür in Frage kommt das Green Fluorescent Protein aus *Aequorea victoria* (GFP) und verschiedene seiner Mutationsvarianten. Die für diese fluoreszierenden Proteine kodierenden cDNAs sind käuflich erhältlich (z. B. Fa. Clontech, Palo Alto, USA). Bevorzugt wird für FP-A das Blue Fluorescent Protein (BFP) und für FP-B das Green Fluorescent Protein (GFP) eingesetzt. BFP kann mit einer Wellenlänge von 380 nm angeregt werden und emittiert maximal bei 440 nm. GFP hingegen wird maximal bei 488 nm angeregt und emittiert bei 507 nm. Die Emission bei 507 nm wird signifikant erhöht werden, wenn es durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zum Fluoreszenzenergietransfer zwischen FP-A (BFP) und FP-B (GFP) kommt. Erfindungsgemäß ist es natürlich auch möglich, für FP-A das Green Fluorescent Protein (GFP) und für FP-B das Blue Fluorescent Protein (BFP) einzusetzen.

Die Fusion der genetischen Information des fluoreszierenden Proteins FP-A mit dem Köderprotein und des fluoreszierenden Proteins FP-B mit dem Beuteprotein erfolgt über molekularbiologische Standardmethoden, die dem Fachmann bestens bekannt sind. Dazu wird die kodierende DNA-Sequenz eines Köderproteins mit der kodierenden DNA-Sequenz des fluoreszierenden Proteins FP-A z. B. mittels enzymatischer Ligation verbunden und gemäß Standardmethoden in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert. Außerdem wird die kodierende DNA-Sequenz eines Beuteproteins mit der kodierenden DNA-Sequenz der fluoreszierenden Proteins FP-B z. B. mittels enzymatischer Ligation verbunden und gemäß Standardmethoden in einen Expressionsvektor kloniert. Es kann hier jeweils auch eine beliebig komplexe Population von Köder- und Beuteproteinen verwendet werden, um eine Bibliothek möglicher Wechselwirkungspartner zu erstellen. Unter genetischer Information sowie kodierender DNA-Sequenz soll erfindungsgemäß cDNA oder genomische DNA, bevorzugt cDNA, verstanden werden.

Als Expressionsvektor eignen sich die dem Fachmann bekannten üblichen Vektoren. Allerdings sollten diese eine getrennte Selektion von "Köderprotein-Vektor" und "Beuteprotein-Vektor" in den Wirtszellen ermöglichen, z. B. durch unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene (z. B. Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol, Streptomycin, Tetracycline, Sulfonamide) oder unterschiedliche auxotrophe Marker (z. B. LEU2, HIS3 oder TRP1). Es ist jedoch auch möglich, beide Fusionsproteine gemeinsam in einen bicistronischen Expressionsvektor zu kombinieren. Geeignete Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z. B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b, pQE8 oder pQE42, für die Expression in Hefe pY100, Ycpad1, pGBT9 oder pGAD424, für die Expression in tierischen Zellen pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGNi-A.

Ferner kennt der Fachmann Verfahren und Wirtszellen, um den Expressionsvektor und das durch ihn kodierte Fusionsprotein zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli* Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, Jm109, BI21 und SG13009, den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, Y 190, CG1 945, EGY48 oder HF7, die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, CQS, Vero und Hela sowie die Insektenzellen Sf9. Geeignete Zellen, bevorzugt Hefezellen, werden mit dem bzw. den Expressionsvektoren transformiert (sequentiell oder synchron) und bevorzugt unter doppelter Selektion ver-

mehrt.

Anschließend wird die Fluoreszenz der Zellen beim Absorptionmaximum eines der beiden fluoreszierenden Proteine (bevorzugt beim Maximum von FP-A) angeregt, beim Emissionsmaximum des anderen fluoreszierenden Proteins (bevorzugt von FP-B) gemessen und das Meßergebnis als Selektionskriterium bei der Isolierung und Klonierung von Zellen herangezogen, die ein potientes Wechselwirkungs-
 paar beinhalten. Diese Messung wird zuvor durch Zellen kalibriert, in denen FP-A und FP-B in verschiedene Vektoren kloniert exprimiert werden, ohne jedoch mit einer weiteren Proteindomäne fusioniert zu sein (Negativkontrolle). Als Positivkontrolle kann ein Fusionsprotein dienen, in dem FP-A und FP-B (ohne Köder- oder Beuteprotein) in der oben beschriebenen Weise aneinander gekoppelt werden und somit eine maximale räumliche Nähe zwischen FP-A und FP-B gegeben ist.

Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt bevorzugt mittels Laser. Die Messung auf FRET erfolgt unter Verwendung geeigneter Filterkombinationen, die vom Fachmann in Abhängigkeit von den Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten fluoreszierenden Proteine ausgewählt werden können. Entsprechend der Grundlagen von FRET muß jede Wechselwirkung zwischen den Fusionsproteinen zu einem Anstieg von FRET führen, der nach geeigneter Kalibrierung des Systems detektiert werden kann. Diese Detektion erfolgt für die Untersuchung bekannter Köder/Beute-Paare bevorzugt fluoreszenzmikroskopisch. Für das Screening von cDNA-Bibliotheken oder kombinatorischen Peptidbibliotheken erfolgt die Messung bevorzugt mittels fluoreszenzgesteuerter Zellsortierung (FACS).

Zur weiteren Identifikation der durch FRET ermittelten Wechselwirkungspartner werden diese auf Agarplatten ausplattiert und aus den individuellen Kolonien Plasmid-DNA isoliert. Diese können dann mittels Standardmethoden sequenziert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat beispielsweise folgende bevorzugte Anwendungen:

- Ein bekanntes Paar möglicher Wechselwirkungspartner wird gemeinsam in einer Wirtszelle exprimiert und deren resultierendes Fluoreszenzspektrum mit dem von Negativ- und Positivkontrollen bzw. anderen Wechselwirkungspartnern verglichen;
- Ein Köder-Fusions-Protein wird mit einer beliebigen komplexen Mischung von Beute-Fusions-Proteinen (gemeinsam oder sequentiell) in geeignete Wirtszellen transformiert bzw. transfiziert und zwar möglichst so, daß jede Zelle nur ein definiertes Paar von möglichen Wechselwirkungspartnern trägt bzw. eine kleine Gruppe solcher Paare. Aus der so entstehenden Wirtszellpopulationen werden dann die Zellen isoliert, die einen signifikanten FRET aufweisen und somit ein potientes Wechselwirkungspaar exprimieren. Durch Isolierung der in diesen Zellen enthaltenen Expressionsvektoren kann dann leicht die Sequenz der beteiligten Wechselwirkungspartner bestimmt werden. Die Mischung der Beuteproteine könnte z. B. aus cDNA-Bibliotheken oder aus kombinatorischen Peptidbibliotheken bestehen.
- Auch das Köderprotein könnte durch eine Population verschiedener Proteine vertreten sein. Dadurch ist es beispielsweise möglich, eine Interaktionsmatrix zu bestimmen, z. B. indem eine cDNA-Bibliothek auf mögliche Wechselwirkungspaare zwischen unbekannten Proteinen durchsucht wird;
- Ein bekanntes Paar von wechselwirkenden Fusionsproteinen wird gemeinsam in Wirtszellen expri-

miert und der Fluoreszenztransfer zwischen den beiden Fusionsproteinen ermittelt. Dann wird ein drittes Protein oder Peptid in denselben Wirtszellen exprimiert und dessen Einfluß auf den FRET zum Analysekriterium gemacht. Auf diese Weise können Proteine oder Peptide ermittelt werden, die eine existierende Wechselwirkung zwischen bekannten Wechselwirkungspartnern stören oder aber verstärken.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen darin, daß es im Gegensatz zum "Yeast Two-Hybrid-System" unabhängig von transkriptionsregulierenden Mechanismen ist und die Lokalisierung der Fusionsproteine im Kern unerheblich ist. So können beispielsweise auch intakte Membranproteine als Köderprotein verwendet werden.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer automatisierten Zellsortierung. Dadurch kann eine hohe Screeningkomplexität erzielt werden. Durch Kombination einer pharmakologisch interessanten Zielsequenz mit einer kombinatorischen Peptidbibliothek können mehrere Millionen Peptidliganden pro Zeiteinheit gescreent werden. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dabei gegenüber bekannten Verfahren, mit denen dies möglicherweise gar nicht durchführbar gewesen wäre, durch eine enorme Zeit- und Arbeitsersparnis aus.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben, welche zeigen:

Fig. 1 Schematische Darstellung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Fig. 2 Schematische Darstellung der Energieverschiebung

Fig. 3 Schematische Darstellung von FRET anhand der Wechselwirkung von Köderprotein mit Beuteprotein

Fig. 4 Genkarte des Expressionsvektors pGBT9

Fig. 5 Genkarte des Expressionsvektors pGAD424

Die Erfindung wird weiter anhand des nachfolgenden Ausführungsbeispiels beschrieben.

BEISPIEL

Zunächst wird ein geeignetes Vektorensystem konstruiert. Hierzu werden die Plasmide pGBT9 (#K-1605-A), pGAD424 (#K1605-B) der Firma Clontech (Palo Alto, US) sowie die Plasmide pRSET B-P4-3 und pRSET B-S65T (Heim und Tsien, Current Biology 1996, 6: 178-182) benutzt.

pGBT9 ist ein möglicher "Köderproteinvektor" des Yeast Two Hybrid Systems, das von Clontech vertrieben wird. Der Vektor enthält ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion in Bakterien, ein TRP1 Gen zur auxotrophen Selektion in Hefe, sowie eine Expressionskassette für die DNA-bindende Domäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (Fig. 4, Clontech Matchmaker "GAL4 Two-Hybrid Vectors Handbook, #PT3062-1) unter der Kontrolle eines Alkoholdehydrogenasepromotors (ADH1) zur Expression in Hefe. Die GAL4-DNA bindende Domäne ist ein essentieller Bestandteil des Yeast Two-Hybrid Systems.

Für den erfindungsgemäßen Zweck wird die GAL4 DNA-bindende Domäne mitsamt ihrem Kernlokalisierungssignal entfernt, indem sie über einen HindIII/-EcoRI-Restriktionsverdau ausgeschnitten wird.

pGAD424 ist ein möglicher "Beuteproteinvektor" des Yeast Two-Hybrid Systems (Fig. 5). Dieser Vektor ist ähnlich aufgebaut wie pGBT9, nur daß er statt des TRP1-Markers ein LEU2 Gen für die Selektion in Hefe enthält und statt der GAL4 DNA-bindenden Domäne die GAL4 Aktivierungsdomäne enthält.

Für den erfindungsgemäßen Zweck wird auch aus diesem

Vektor die GAL4 Aktivierungsdomäne durch einen HindIII/EcoRI Verdau entfernt. Dazu werden zunächst weitere im Vektor befindliche HindIII Schnittstellen über Partialverdau, Auffüllen der Schnittstelle mit Pfu-Polymerase und anschließend er "blunt-end-Ligation" entfernt.

Die kodierenden Sequenzen der GFP-Varianten S65T und P4-3 (Heim und Tsien, *Current Biology* 6: 178-182 (1996)) werden nun durch PCR amplifiziert und an ihren 5' und 3'-Enden mit HindIII bzw. EcoRI-Schnittstellen versehen. Dazu werden die Oligonucleotidprimer GFP-EcoRI-3' (5'-CGGGAATTCCTTTGTATAGTTCATCCAT-3'), sowie GFP-HindIII-5' (5'-TCCAAGCTTATGAGTAAAGGAGAA-GAAGCTT-3') (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet. Da die kodierenden Sequenzen von P4-3 und S65T in ihren 5' und 3'-terminalen Regionen identisch sind, kann das gleiche Primerpaar für beide Reaktionen verwendet werden.

Die so gewonnenen kodierenden Sequenzen von P4-3 und S65T werden nun über eine Gelelektrophorese aufgereinigt und durch eine Ligasereaktion in die wie oben beschriebenen vorbereiteten Vektoren pGBT9 und pGAD424 kloniert. Die resultierenden Konstrukte pGBT-BFP und pGAD-GFP enthalten nun die kodierende Sequenz des Blau Fluoreszierenden Proteins BFP (P4-3) bzw. des Grün Fluoreszierenden Proteins GFP (S65T) unter der Kontrolle des ADH1-Promotors zur Expression in Hefe. Beiden GFP-Varianten ist außerdem der ursprüngliche Polylinker der Plasmide pGBT9 und pGAD424 nachgestellt. Sie ersetzen die für das Yeast Two-Hybrid System essentiellen Komponenten des GAL4 Transkriptionsfaktors.

Die gewonnenen Plasmide werden nun in kompetente Zellen *E.coli* DH5 α (Gibco BRL) transformiert und in ampicillinhaltigem LB-Medium amplifiziert. Nach einer Plasmidpräparation durch Qiagen Kits steht somit ein geeignetes Vektorensystem zur Verfügung.

Als Beispiel für ein geeignetes Köderprotein dient die C-terminale Domäne des Purinrezeptors P2X₂ (Brändle et al., *FEBS Lett.* 404: 294k-298 (1997)). Davon wird die in einem Vektor vorliegende cDNA verwendet. Durch eine PCR Amplifikation wird die Domäne zwischen der Transmembrandomäne TM2 und dem intrazellulären C-Terminus amplifiziert. Dazu werden die Oligonukleotidprimer P2X₂-5' (5'-CGGGAATTCACGTTTCATGAACAAAAAC-3') und P2X₂-3' (5'-TTAGGATCCTCAAAGGGCCAAACCTTTGGGGTC-3') verwendet. Das gewonnene Fragment wird dann über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in den Vektor pGBT-BFP kloniert und in der üblichen Weise amplifiziert.

Für eine geeignete Bibliothek von Beuteproteinen wird eine mRNA-Isolierung aus Rattenhirn und cDNA-Synthese bei einer Firma in Auftrag gegeben, die solche Serviceleistungen kommerziell anbieten, z. B. Clontech oder Stratagene. Die so erhaltene cDNA wird dann in der üblichen Weise über die EcoRI Schnittstelle in den vorbereiteten und amplifizierten Vektor pGAD-GFP kloniert, in hochkompetente *E.coli* Zellen (Library Efficiency DH5a, GibcoBRL) transformiert und in der für cDNA-Bibliotheken üblichen Weise amplifiziert (siehe z. B. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley).

Um beide Konstrukte in Hefezellen zu bringen, werden kompetente Zellen des Hefestamms EGY48 (Fa. Invitrogen) hergestellt. (Dieser Hefestamm trägt zwei Mutationen, die die Gene *leu2* und *trp1* funktionslos machen. Diese Mutationen können durch die *TRP1* und *LEU2* Gene der Vektoren kompensiert werden). Dazu wird die Lithiumacetat-Methode entsprechend dem Clontech Two-Hybrid Handbuch benutzt (#PT3024-1) unter Verwendung des Yeastmaker Transformationssystems (Clontech, #K1 k606-1). Die gewonnenen kompetenten Hefezellen werden zunächst mit

dem Beuteplasmid pGBT-BFP-P2X₂ transformiert und auf tryptophanfreien Agrarplatten ausplattiert. Die Transformanten werden dann in tryptophanfreiem Flüssigminimalmedium vermehrt und nach der Lithiumacetatmethode wieder kompetent gemacht. Es erfolgt dann eine Transformation im Bibliotheksmaßstab, wieder entsprechend dem Clontech Handbuch. Dieser Transformationsansatz wird für mehrere Stunden in einer Schüttelkultur in tryptophan- und leucinfreiem Flüssigminimalmedium amplifiziert, bis die mittlere Logphase erreicht ist. Dann werden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert und in Wasser resuspendiert und auf eine Zelldichte von 10⁷ pro Milliliter verdünnt.

Die so gewonnene Zellsuspension wird dann in einen fluoreszenzaktivierten Zellsorter vom Typ FX-Elite-ESP (Coulter) eingespeist und mit einer Zählrate von circa 20.000 Zellen pro Sekunde vermessen. Es wird mit einem 50 mW UV-Laser im Bereich des Absorptionsmaximums von P4-3 bei 380 nm angeregt und die Emission im Emissionsmaximum von S65T bei 511 nm gemessen. Zellen, die den unspezifischen Hintergrund signifikant überschreiten, werden in Mikrotiterplatten mit leucinfreiem Minimalmedium gesammelt und durch Schütteln bei 30°C vermehrt. Die so isolierten Zellklone werden dann zur Isolierung der pGAD-GFP-Library Plasmide herangezogen, unter Verwendung der im Clontech-Handbuch beschriebenen Standardmethoden.

Zur Kontrolle werden die isolierten Klone dann in die Hefezellen zurücktransformiert und zwar einmal mit dem Köderplasmid pGBT-BFP-P2X₂ und zum anderen mit dem leeren Köderplasmidvektor pGBT-BFP. Die Fluoreszenzspektren der beiden Transformanten werden dann verglichen, um solche Interaktionskandidaten auszuschließen, die direkt mit dem Blau Fluoreszierenden Protein, nicht aber mit dem Köderprotein interagieren.

So verifizierte Kandidaten werden dann wieder auf selektiven Minimalmediumplatten ausplattiert und die Sequenz der potentiell interagierenden Beutedomäne durch Standardmethoden der Molekularbiologie bestimmt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung von Peptid- bzw. Proteinwechselwirkungspartnern, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens zwei Peptide bzw. Proteine an unterschiedlich fluoreszierende Komponenten gekoppelt sind, wobei die Absorptions- und Emissionsspektren der fluoreszierenden Komponenten derart überlappen, daß Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer möglich ist und die fluoreszierenden Komponenten durch eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen bzw. Peptiden so zusammengebracht werden, daß FRET auftritt und gemessen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Peptide bzw. Proteine und fluoreszierenden Komponenten in Form von Fusionspeptiden bzw. -proteinen vorliegen und deren genetische Information in Wirtszellen in einem Expressionssystem eingebracht wird und FRET dort gemessen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die fluoreszierenden Komponenten mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren Blue Fluorescent Protein und Green Fluorescent Protein aus *Aequorea victoria* sind.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Wirtszellen Hefezellen sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-

Transfers mittels Fluoreszenzmikroskopie oder fluoreszenzgesteuerter Zellsortierung (FACS) erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Anregung der Fluoreszenz mittels Laser geschieht.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei der Protein- bzw.

Peptidanteil des Fusionsproteins bzw. -peptids aus einer kombinatorischen Peptidbibliothek stammt oder das Expressionsprodukt einer cDNA-Bibliothek ist.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

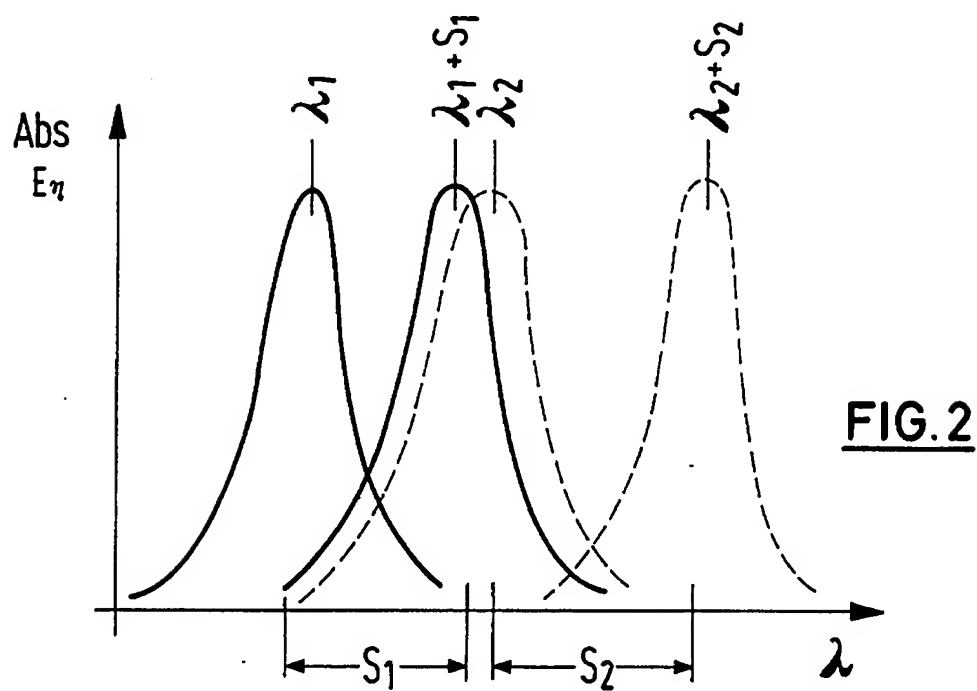
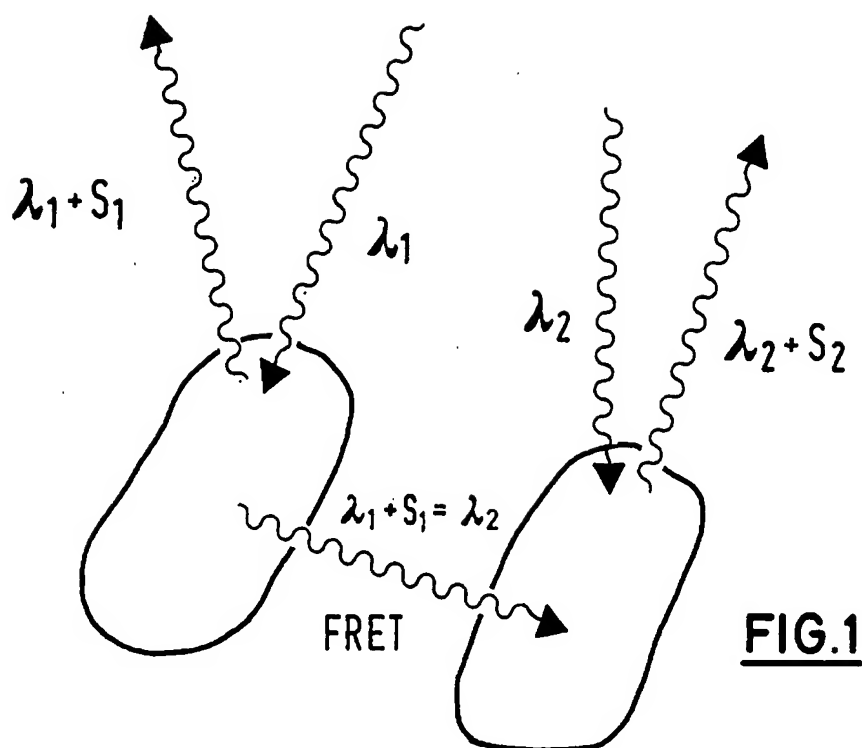
50

55

60

65

- Leerseite -



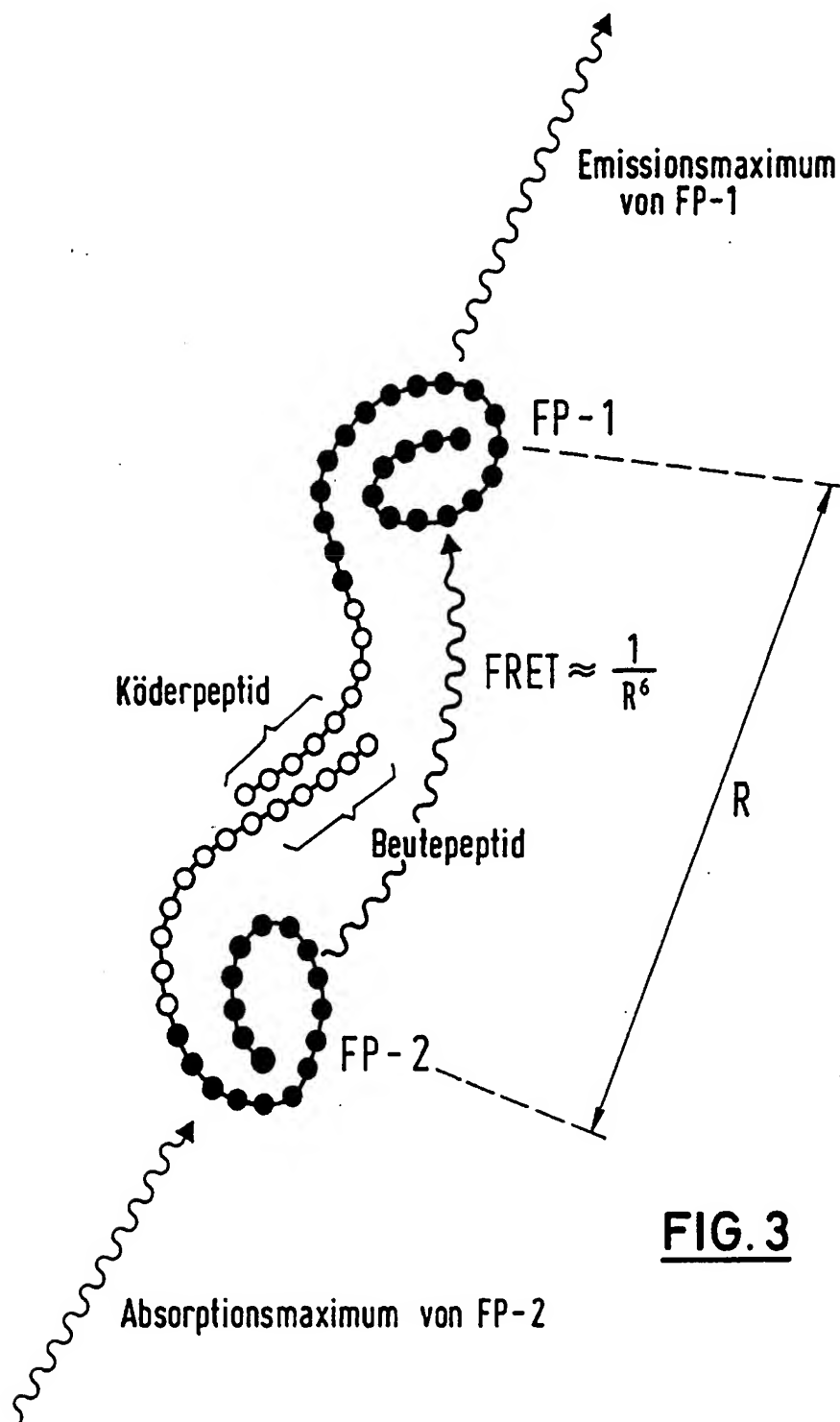


FIG. 3

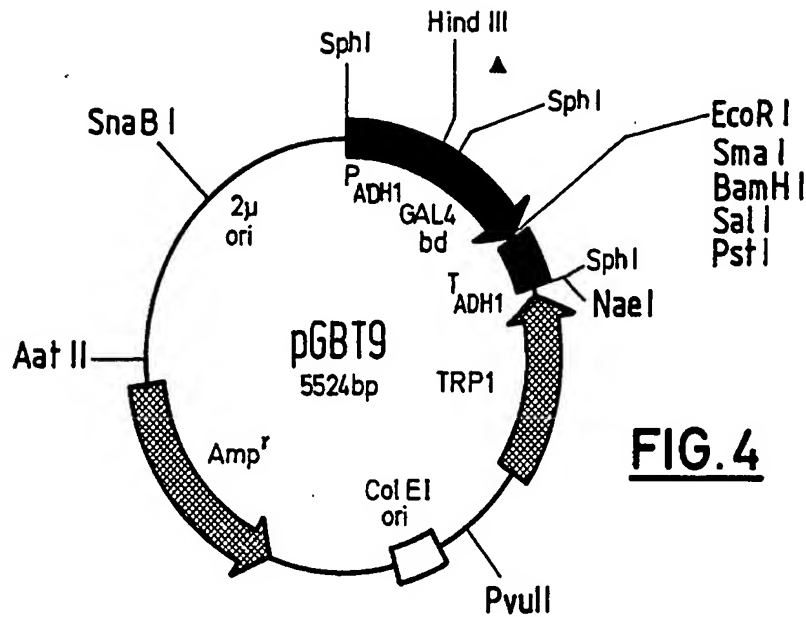


FIG. 4

T = Transkriptionsterminations - Sequenz
▲ = SV 40 Kernlokalisationssignal

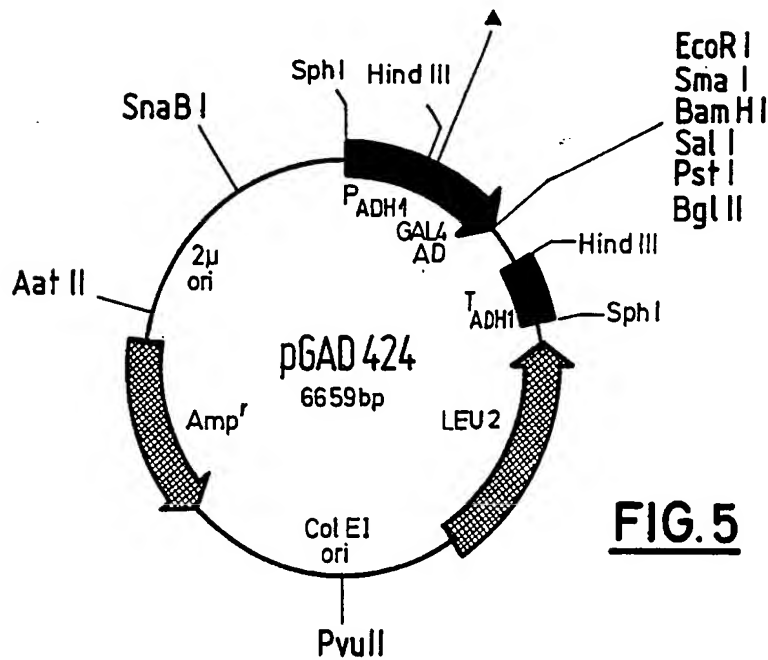


FIG. 5

T = Transkriptionsterminations - Sequenz
▲ = SV 40 Kernlokalisationssignal